

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-39378

(43)公開日 平成7年(1995)2月10日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
9/12	Z N A	9359-4B		
// (C 1 2 N 15/09		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			(C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-206926

(22)出願日 平成5年(1993)7月30日

(71)出願人 591038141

寶酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 高原 和彦

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 佐川 佳代

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 林 延江

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 逆転写酵素遺伝子

(57)【要約】

【目的】 ラウス関連ウイルス (Rous associated virus 2、RAV-2) 由来の逆転写酵素をコードする遺伝子、及び該酵素の製造方法を提供する。

【構成】 単離されたRAV-2由来逆転写酵素遺伝子。該遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物からRAV-2由来逆転写酵素を採取するRAV-2由来逆転写酵素の製造方法。RAV-2プロウイルスDNAより、約3.8kbのDNA断片をクローニングし、該クローニング断片の塩基配列の一部を決定し、RSVの塩基番号184~2868の部分にRAV-2由来逆転写酵素をコードする2685bpの領域を特定した。そのコード領域の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【効果】 遺伝子工学用試薬として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたRAV-2由来逆転写酵素遺伝子。

【請求項2】 塩基配列が配列表の配列番号1で表される請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 プラスミドpT8RAVから単離される請求項1記載の遺伝子。

【請求項4】 請求項1記載の遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物からRAV-2由来逆転写酵素を採取することを特徴とするRAV-2由来逆転写酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ラウス関連ウイルス(Rous associated virus 2、RAV-2)由来の逆転写酵素をコードする遺伝子、及び該酵素の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 逆転写酵素はRNAを鋳型としてDNAを合成する酵素であり、RNA依存性DNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼとも呼ばれる。逆転写酵素は現在まで種々の由来のものが知られており、その生化学的研究がなされている。一方、近年の分子遺伝学の進展に伴い、mRNAよりcDNAを合成するために逆転写酵素が多用されている。特に高等生物の遺伝子をクローニングする際、このcDNA合成は必須のステップであり、遺伝子工学分野において逆転写酵素の重要性はますます高くなってきている。RAV-2由来の逆転写酵素は遺伝子工学用試薬として適した性質をもつ有用な酵素であり、市販もされている。該酵素の製造法としては、ジャーナル オブバイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、第105巻、第974～978頁(1988)に記載されているものがある。すなわち、RAV-2を初代ニワトリ胚線維芽培養細胞に感染させ、培養上清に放出されるウイルス粒子を超速心法により回収し、更にこの粒子より種々の精製手段を用いて逆転写酵素を製造する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、この方法は操作が煩雑な上に、培養上清に含まれるRAV-2の量は少なく、逆転写酵素の大量製造は困難である。一方、該逆転写酵素の遺伝子は単離されておらず、当該遺伝子を発現ベクターに結合して遺伝子工学的に発現させる方法についても明らかにされていない。本発明の目的は、RAV-2由来逆転写酵素をコードする遺伝子特定し、該遺伝子を用いたRAV-2由来逆転写酵素の製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は単離されたRAV-2由来逆転写酵

素遺伝子に関する。本発明の第2の発明はRAV-2由来逆転写酵素の製造方法に関し、第1の発明の遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物からRAV-2由来逆転写酵素を採取することを特徴とする。

【0005】 本発明者らは、RAV-2プロウイルスDNAより、RAV-2由来逆転写酵素遺伝子全領域を含む2685bpのDNAをクローニングすることに成功し、更にこのDNA断片を含むプラスミドを導入した微生物、特に大腸菌を培養することにより、菌体中にRAV-2由来逆転写酵素が蓄積することを見出し、本発明を完成した。

【0006】 以下、本発明を具体的に説明する。本発明の遺伝子は、例えば次に例示する工程により得ることができる。

(1) ニワトリ初代線維芽細胞にRAV-2を感染させ、一定時間の後に細胞を回収する。これよりRAV-2プロウイルスを得る。

(2) プロウイルスをDNA供与体として、λgt10をベクターとしたライブラリーを作製する。

(3) ライブラリーより、目的のDNA断片を有するファージをスクリーニングする。

(4) ファージより、目的の逆転写酵素をコードする遺伝子を含むDNAを断片化しプラスミドベクターに結合させる。

(5) このプラスミドを宿主に導入し、目的のDNA断片を含む形質転換体からプラスミドを調製し、これを用いて遺伝子の塩基配列を決定する。

(6) 決定された塩基配列を基にして、逆転写酵素をコードする領域のみをポリメラーゼ チェイン リアクション法(PCR法)によって増幅する。

(7) 増幅されたDNA断片を大腸菌内で発現するためのプラスミドベクターに結合する。これを宿主に導入し、目的の形質転換体を選択する。

抽出、精製、制限酵素による切断等は、公知の方法を用いることができ、当該法の詳細は、例えばモレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル (Molecular cloning, a Laboratory Manual) 第75～178頁、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版(1982)に記載されている。

【0007】 プロウイルスDNAは、例えば次のようにして得ることができる。すなわち、ニワトリ初代培養胚線維芽細胞を10%子ウシ血清を含む動物細胞用培地で数日間培養し、これにRAV-2を接触・感染させ、培養を続ける。細胞に侵入したRAV-2遺伝子(RNA)は、ウイルス由来の逆転写酵素によって、プロウイルスDNAに変換される。なお、その後このプロウイルスDNAは、更にニワトリ細胞の染色体遺伝子に組込まれてしまうので、組込まれる以前のプロウイルスDNAを得るには、感染から回収までの時間が重要となる。ウ

3

イルス感染後、プロウイルスDNAのほぼ全長が合成され、かつ核外に存在する時間を特定し、この条件を基に感染細胞を回収するハート法〔ジャーナル オブ モレキュラーバイオロジー (Journal of Molecular Biology)、第26巻、第365～369頁(1967)〕の改良法によって核外DNAを回収する。

【0008】このDNAを制限酵素で消化し、例えばファージベクターλgt10と結合させ、これをインビトロでパッケージングし、ファージ粒子を形成させ、ライブラリーを作成することができる。更にこのファージを大腸菌、例えばC600hfl株に感染させプレート上でプラークを形成させ、このプラークをフィルターにトランスファーしハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0009】スクリーニングに用いるプローブとしては、例えばRAV-2と近縁のラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus, RSV)の逆転写酵素上流をコードする遺伝子の一部を化学合成したものを用いることができる。なお、RSVの遺伝子の塩基配列はセル(Cell)、第32巻、第853～869頁(1983)に記載されている。これによるスクリーニングによって得られたファージを更に純化し、これからファージDNAを調製する。このDNAより挿入断片を切り出し適当なクローニングベクター、例えばpBR322、pUC18、pTV118N等に結合させる。次いで、このファージDNA断片を組み込んだプラスミドを宿主大腸菌に導入させるが、宿主大腸菌としては、形質転換能を有するものであれば、野生株、変異株のいずれも使用できる。用いるベクタープラスミドにより、用いる宿主大腸菌を適宜変えることも可能である。

【0010】この様にして目的のDNA断片を宿主に導入させ、プラスミドベクターの特性、例えばpTV118Nにクローン化する場合には、アンピシリン耐性を指標に選択することができる。クローン化されたDNAの塩基配列決定は、公知の方法を用いて行うことができる。

【0011】本発明者らは、上記RSVの塩基配列から配列表の配列番号2で表されるプローブDNAを作製してライブラリーをスクリーニングし、約3.8kbのDNA断片をクローニングした。更に、該クローニング断片の塩基配列の一部を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号3に示す。更に、該塩基配列をRSVのそれ等と比較することにより、塩基番号184～2868の部分にRAV-2由来逆転写酵素をコードすると思われる2685bpの領域を特定した。そのコード領域の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0012】次に、配列表の配列番号1に示されるコード領域のみを単離する方法としては、例えばPCR法を用いることができる。その際、用いるプライマーの塩基

4

配列を工夫することにより、増幅断片の両端に任意の塩基配列を導入することができる。本発明者らは、配列表の配列番号4及び5に示されるプライマーを用いてPCR法にてDNAを増幅した。これらプライマーを用いることにより、該逆転写酵素のN末端アミノ酸をコードするコドン(AC T)の前にE c o R Iサイトを、翻訳停止コドンの下流にS a c Iサイトを導入した。

【0013】次に、増幅されたDNA断片を発現ベクターに連結させる。このとき、発現を安定化させるために、遺伝子の下流に転写終結配列を挿入しても良い。転写終結配列としては、ジエンボジャーナル(The EMBO Journal)、第3巻、第2437～2442頁(1984)に記載されている大腸菌分泌ベクターpIN-III-ompA₁上のものがある。形質転換する方法は公知のものが使用でき、宿主に応じて選択すれば良い。本発明者らは、増幅されたDNA断片をE c o R IとS a c Iで処理した後、プラスミドpTV118N(宝酒造社)の同サイトに翻訳フレームが合うように結合させた。更に、逆転写酵素をコードする遺伝子の下流に前述の転写終結配列を挿入した。このようにして、RAV-2由来逆転写酵素を発現するプラスミドpT8RAVを構築した(図1)。次に、pT8RAVを大腸菌JM109株に導入し、RAV-2由来逆転写酵素を生産する形質転換体を作製した。該形質転換体はEscherichia coli JM109/pT8RAVと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13716として寄託されている。

【0014】逆転写酵素活性を確認する方法としては、前出のジャーナル オブ バイオケミストリーに記載の方法を用いることができるが、著量を生産している場合には菌体抽出物を、直接ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で検出することができる。また、該抽出物より逆転写酵素活性を指標に粗精製し、確認することもできる。

【0015】

【実施例】以下に本発明の実施例を挙げるが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0016】実施例1

(1)プロウイルスDNAの調製

10日発育鶏卵(ラインM、日生研より入手)3個から胎児を取り出し、内臓、頭部、手足を取り除き、次いでトリプシン処理〔0.5% (w/v)トリプシン、0.2% (w/v)EDTAをダルベッコホスフェートセライン(Dulbecco's phosphate saline)(2価カチオン除去、ギブコ社)で10倍に希釈した溶液中で30℃で約20分間かくはんする〕により胚線維芽細胞の懸濁液を5% (v/v)新生子ウシ血清(三菱化成社)及び5% (v/v)トリプトースホスフェートブロスを含むイーグル(Eagle)MEM培地(ギブコ社)100mlを入れたローラーボトル(ファルコン#3027、ベクトン

5

ディキンソン社、培養面積 850cm^2) 3本に 0.5×10^6 セルずつ分注播種した。これらのボトルを 37°C で 0.3rpm の速度で回転培養し、付着培養を行った。培養開始3日後にポリブレン(アルドリッチ社)を添加($10\mu\text{g}/\text{ml}$)し細胞層表面を処理したのち培養液を除去した。次いでRAV-2(東京大学附属医科学研究所より入手)を含むTNE緩衝液(10mM トリス-HCl pH7.5、 100mM NaCl、 1mM EDTA) 20ml を上記ボトルに加えることにより感染を45分間行った。次いで前記新生子ウシ血清及びトリプトスホスフェートブロスを含むイーグルMEM培地 80ml を添加し培養を開始した。培養3日目に細胞を回収し、ローラーボトル内の胚線維芽細胞をトリプシン処理(20ml)し、細胞を回収した。これを氷冷したMEM培地 50ml を用いて洗浄し、次に 25ml の 10mM トリス-HCl pH7.8、 10mM EDTAで洗浄した。更にこの細胞に 60°C に保温した、 1% SDS、 10mM トリス-HCl pH7.8、 10mM EDTA 20ml を加え細胞を溶解させた。これに 5ml の 5M NaClを加え、 4°C で8時間放置した。 25000rpm で1時間遠心した後、上清を回収した。これに最終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにプロテイナーゼK(ペーリンガー社)を加え、 37°C で1時間反応させた。反応後、この溶液にTE緩衝液(10mM トリス-HCl pH8.0、 1mM EDTA)で飽和したフェノールを加え、ゆるやかに混合した後、遠心分離して水層を採取した(以下この操作をフェノール処理という)。これに2倍容のエタノールを加え、 -70°C で30分間保持した後、遠心分離を行い、プロウイルス化したRAV-2遺伝子を含むDNA画分を得た。

【0017】(2)スクリーニング

このプロウイルスを含むDNA画分の $10\mu\text{g}$ をEcoRI 20 単位で処理し、その後フェノール処理を行った。これに2倍容のエタノールを加え -70°C で30分間保持した後、遠心分離を行い、DNAを回収した。このDNAを $10\mu\text{l}$ のTE緩衝液に溶解した。このDNA溶液 $1\mu\text{l}$ にEcoRI処理したファージベクター $\lambda\text{gt}10$ (ストラタジーン社) $1\mu\text{l}$ を加え、T4 DNAリガーゼ 100 単位を用いリガーゼ緩衝液(66mM トリス-HCl pH7.6、 6.6mM MgCl₂、 10mM DTT、 0.5mM ATP)中 16°C で4時間反応させ両者を結合させた。これを1%ファージパッケージングキット(ギガバックゴールド、ストラタジーン社)を用いてパッケージングし、大腸菌C600hfl株を宿主としてプラークを形成させた。すなわち、 0.2mM マルトース及び 2mM MgSO₄を含むL-ブロス培地中で大腸菌C600hfl株を 37°C で一晩培養し、これに希釈したファージ液を加え、 37°C で15分間インキュベートを行った後に、 0.7% アガロースを含む

6

L-ブロスと共に 1.5% アガロース含有L-ブロスプレートに重層し、これを 37°C で一晩培養し、プラークを形成させた。次に、約 1×10^6 個のファージプラークをナイロンメンブラン(ハイボンド-N、アマシャム社)に移し、プローブDNAと $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$: 0.15M NaCl、 0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)、 $5 \times \text{デンハーツ液}$ ($1 \times \text{デンハーツ液}$: 0.02% (W/V) ポリビニルピロリドン、 0.02% (W/V) ウシ血清アルブミン、 0.02% (W/V) フィコール400)、及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケDNAを含むハイブリダイゼーション溶液中で、 60°C で一晩ハイブリダイズさせた。プローブDNAは配列表の配列番号2で表されるDNAを合成・精製し、メガラベルキット(宝酒造社)を用いて [γ -³²P] ATPで放射性標識したものをを用いた。次に $2 \times \text{SSC}$ 、 0.5% SDSを含む洗浄液で 55°C 、5分、更に同洗浄液で 40°C 、5分間、2回フィルターを洗浄した。フィルターを増感紙に当てて、一晩、 -70°C でオートラジオグラフィーを行った。この結果、3つのポジティブクローンが得られ、それぞれKI1、KI5、KI9と命名した。

【0018】(3)塩基配列の決定

実施例1-(2)で得られた3個のファージプラークをそれぞれ $400\mu\text{l}$ のSM緩衝液(5.8g のNaCl、 2g のMgSO₄ · 7H₂O、 50ml の 1M トリス-HCl pH7.5、 5ml の 2% ゼラチンを 1 リットルの滅菌水に溶解したもの)に懸濁し、 4°C で一晩、ファージを溶出させた。3個のプラーク由来のファージ液それぞれ $10\mu\text{l}$ を実施例1-(2)のように培養した宿主大腸菌C600hflの培養液 0.5ml に感染させ、 100ml のL-ブロス培地中で4~6時間培養し溶菌させた。更に溶菌液を遠心し残渣を除いて、DNAse I(宝酒造社)及びRNAse A(シグマ社)を各 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加え、 37°C で30分処理した。これに $1/10$ 容の 2.5M NaCl、 20% ポリエチレングリコール6000を加え、 4°C 、1時間放置した後、ファージを遠心回収した。回収したそれぞれのファージを 2ml のSM緩衝液に溶解し、フェノール処理、フェノール-クロロホルム処理及びクロロホルム処理を行い、更に $1/10$ 容の 3M 酢酸ナトリウムと2倍量のエタノールを加えた。これを -70°C 、1時間放置し、DNAを遠心回収した。次に、これらのDNAをEcoRIで処理し、 1% アガロースゲルにて電気泳動し、ファージより切り出されたDNA断片を回収して、シーケンス用ベクターM13mp18(宝酒造社)のEcoRIサイトにライゲーションし、サブクローニングを行った。このうち、クローンKI1より得られたサブクローンをM13mp18-KI1と命名した。M13mp18-KI1の挿入断片の塩基配列の一部をキロシーケンス用ディレクションキット(宝酒造

社)を用いてダイデオキシ法にて決定した。その塩基配列を配列表の配列番号3に示す。次に、該塩基配列を前述のRSVのそれと、更に、ジョンソンらが同定した、レトロウイルス中の逆転写酵素の領域(プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA)、第83巻、第7648~7652頁(1986))と比較することにより、塩基番号184~2868の部分に逆転写酵素をコードする部分を同定した。該コード領域の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0019】(4) RAV-2由来逆転写酵素発現ベクターの構築

配列表の配列番号1に示される逆転写酵素をコードする部分のみを得るために、配列表の配列番号4及び5で示されるプライマーを合成し、PCRを行った。すなわち、これらのプライマー100 pmolと、1 ngのM13mp18-K11を用いて、全量100 µlで95℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の条件でPCRを行った。反応後、反応液の5 µlをとりアガロースゲル電気泳動で分析した結果、約2.7 kbのDNA断片が特異的に増幅していた。このDNA断片をEcoRIとSacIそれぞれ20単位で処理し、同制限酵素で処理したベクターpTV118N(宝酒造社)に、T4 DNAリガーゼを用いて結合させた。このpTV118Nのlacプロモーターの下流にRAV-2由来逆転写酵素をコードする遺伝子が挿入された発現ベクターをpT8RAと命名した。更に、RAV-2由来逆転写酵素をコードする遺伝子の下流に転写終結配列を導入した。すなわち、2 µgの大腸菌分泌ベクターpIN-III-ompA₁をBamHI 20単位で処理し、その後、生じた末端をランティングキット(宝酒造社)を用いて平滑末端化した。これをSalIで処理し、アガロースゲル電気泳動によって約0.9 kbpの転写終結配列を分離、取得した。次に、2 µgのpT8RAをSmaI及びSalI各20単位で処理し、フェノール処理しエタノール沈殿によりDNAを回収し、これと先に得た転写終結配列をT4 DNAリガーゼを用いて結合させた。このプラスミドをpT8RAVと命名した。pT8RAVの構築図を図1に示す。次に、pT8RAVを大腸菌JM109株に導入し、RAV-2由来逆転写酵素遺伝子を含有する形質転換体を得た。該形質転換体をEscherichia coli JM109/pT8RAVと命名、表示し、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-13716)。

【0020】(5) RAV-2由来逆転写酵素の形質転換体での発現

Escherichia coli JM109/pT8RAV (FERM P-13716)を、アンピシリン50 µg/mlを含むLB

ロス培地100 ml中、37℃で振とう培養し、対数増殖期中期にイソプロピルチオガラクトシド(宝酒造社)を0.4 mMになるように加え、更に一晚培養を続けた。培養後、菌体を遠心回収し一部をSDS-PAGEにより分析したところ、RAV-2由来逆転写酵素と推定される分子量約98000のタンパク質が認められた。該タンパク質は、菌体全タンパク質の約10%を占めた。次に、Escherichia coli JM109/pT8RAVの培養菌体を20 mM リン酸緩衝液pH7.5、15 mM β-メルカプトエタノール、10 mM EDTA中で超音波破碎し、その後、遠心分離により不溶性画分を除いた。この段階で逆転写酵素と推定されるタンパク質の約20%が可溶性画分として回収された。この可溶性画分を10 mM リン酸緩衝液 pH7.5、30 mM KCl、5 mM β-メルカプトエタノール、0.2% ノニデットP40(NP-40)、10%グリセロールに対して透析し、その後同緩衝液で平衡化したイオン交換体DEAE-52カラム(カラム容量20 ml、ワットマン社)に吸着させた。カラムを100 mlの同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液中KCl濃度30 mMから70 mMまでの塩濃度勾配で溶出した。各フラクションを50 mM トリス-HCl pH8.3、10 mM MgCl₂、3 mM ジチオスレイトール(DTT)、50 mM NaClに対し一晚透析し、逆転写酵素活性を測定した。すなわち、50 mM トリス-HCl、10 mM MgCl₂、3 mM DTT、50 mM NaCl、20 µg/ml ポリアデニル酸/オリゴチミジル酸[poly(rA)·oligo(dT)]、100 µM [³H]-TTP(チミジントリホスフェート)(222 dpm/pmol)及び0.1% NP-40に各フラクションを加え、20 µlの系で、37℃、30分間反応させた。測定の結果、溶出液KCl濃度40 mM付近に逆転写酵素活性を認めた。活性画分をSDS-PAGEによって分析したところ、分子量約98000のタンパク質を認めた。なお、プラスミドpTV118Nを有する大腸菌JM109株について同様の実験を行ったが、相当する画分に逆転写酵素活性は見出されなかった。これらより、Escherichia coli JM109/pT8RAVは確かにRAV-2由来逆転写酵素を発現していた。

【0021】

【発明の効果】本発明により、遺伝子工学用試薬として有用なRAV-2由来逆転写酵素の遺伝子、及び該酵素の遺伝子工学的製造法が提供された。

【0022】

【配列表】

【0023】配列番号:1

配列の長さ:2685

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列:

ACT GTT GCG CTA CAT CTG GCT ATT CCG CTC AAA TGG AAG CCA GAC	45
Thr Val Ala Leu His Leu Ala Ile Pro Leu Lys Trp Lys Pro Asp	
5 10 15	
CAC ACG CCT GTG TGG ATT GAC CAG TGG CCC CTT CCT GAA GGT AAA	90
His Thr Pro Val Trp Ile Asp Gln Trp Pro Leu Pro Glu Gly Lys	
20 25 30	
CTT GTA GCG GTA ACG CAA TTA GTG GAA AAA GAA TTA CAG TTA GGA	135
Leu Val Ala Val Thr Gln Leu Val Glu Lys Glu Leu Gln Leu Gly	
35 40 45	
CAT ATA GAA CCC TCA CTT AGC TGT TGG AAC ACA CCT GTC TTT GTG	180
His Ile Glu Pro Ser Leu Ser Cys Trp Asn Thr Pro Val Phe Val	
50 55 60	
ATC CGG AAG GCT TCC GGG TCT TAT CGC TTA TTG CAT GAC TTA CGC	225
Ile Arg Lys Ala Ser Gly Ser Tyr Arg Leu Leu His Asp Leu Arg	
65 70 75	
GCT GTT AAC GCC AAG CTT GTT CCT TTT GGG GCT GTC CAA CAG GGG	270
Ala Val Asn Ala Lys Leu Val Pro Phe Gly Ala Val Gln Gln Gly	
80 85 90	
GCG CCA GTT CTC TCC GCG CTC CCG CGT GGC TGG CCC CTG ATG GTT	315
Ala Pro Val Leu Ser Ala Leu Pro Arg Gly Trp Pro Leu Met Val	
95 100 105	
CTA GAC CTC AAG GAT TGC TTC TTT TCT ATC CCT CTT GCG GAA CAA	360
Leu Asp Leu Lys Asp Cys Phe Phe Ser Ile Pro Leu Ala Glu Gln	
110 115 120	
GAT CGC GAA GCT TTT GCA TTT ACG CTC CCC TCT GTG AAT AAC CAG	405
Asp Arg Glu Ala Phe Ala Phe Thr Leu Pro Ser Val Asn Asn Gln	
125 130 135	
GCC CCC GCT CGA AGA TTC CAA TGG AAG GTC TTG CCC CAA GGG ATG	450
Ala Pro Ala Arg Arg Phe Gln Trp Lys Val Leu Pro Gln Gly Met	
140 145 150	
ACC TGT TCT CCC ACT ATC TGT CAG TTG GTA GTG GGT CAG GTG CTC	495
Thr Cys Ser Pro Thr Ile Cys Gln Leu Val Val Gly Gln Val Leu	
155 160 165	
GAG CCC TTG CGA CTC AAG CAC CCA GCT CTG CGC ATG TTG CAT TAT	540
Glu Pro Leu Arg Leu Lys His Pro Ala Leu Arg Met Leu His Tyr	
170 175 180	
ATG GAC GAT CTT TTG CTA GCC GCC TCA AGT CAT GAT GGG TTG GAA	585
Met Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser His Asp Gly Leu Glu	
185 190 195	
GCG GCA GGG AAG GAG GTT ATC GGT ACA TTG GAA AGA GCC GGG TTC	630
Ala Ala Gly Lys Glu Val Ile Gly Thr Leu Glu Arg Ala Gly Phe	
200 205 210	
ACT ATT TCG CCG GAT AAG ATC CAG AGG GAG CCC GGA GTA CAA TAT	675
Thr Ile Ser Pro Asp Lys Ile Gln Arg Glu Pro Gly Val Gln Tyr	
215 220 225	
CTT GGG TAC AAG TTA GGC AGT ACG TAT GTA GCA CCC GTA GGC TTG	720
Leu Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Thr Tyr Val Ala Pro Val Gly Leu	
230 235 240	

11	12
GTA GCA GAA CCC AGG ATA GCC ACC TTG TGG GAT GTT CAA AAG CTG	765
Val Ala Glu Pro Arg Ile Ala Thr Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu	
245 250 255	
GTG GGG TCA CTT CAG TGG CTT CGC CCA GCG TTA GGG ATC CCG CCA	810
Val Gly Ser Leu Gln Trp Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ile Pro Pro	
260 265 270	
CGA CTG ATG GGT CCC TTT TAT GAG CAG TTA CGA GGG TCA GAT CCT	855
Arg Leu Met Gly Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Arg Gly Ser Asp Pro	
275 280 285	
AAC GAG GCG AGG GAA TGG AAT CTA GAC ATG AAA ATG GCC TGG AGA	900
Asn Glu Ala Arg Glu Trp Asn Leu Asp Met Lys Met Ala Trp Arg	
290 295 300	
GAG ATC GTA CAG CTT AGC ACT ACT GCT GCC TTG GAA CGA TGG GAC	945
Glu Ile Val Gln Leu Ser Thr Thr Ala Ala Leu Glu Arg Trp Asp	
305 310 315	
CCT GCC CAG CCT CTG GAA GGA GCG GTC GCT AGA TGT GAA CAG GGG	990
Pro Ala Gln Pro Leu Glu Gly Ala Val Ala Arg Cys Glu Gln Gly	
320 325 330	
GCA ATA GGG GTC CTG GGA CAG GGA CTG TCC ACA CAC CCA AGG CCA	1035
Ala Ile Gly Val Leu Gly Gln Gly Leu Ser Thr His Pro Arg Pro	
335 340 345	
TGT TTG TGG TTA TTC TCC ACC CAA CCC ACC AAG GCG TTT ACT GCT	1080
Cys Leu Trp Leu Phe Ser Thr Gln Pro Thr Lys Ala Phe Thr Ala	
350 355 360	
TGG TTA GAA GTG CTC ACC CTT TTG ATT ACT AAG CTA CGC GCT TCG	1125
Trp Leu Glu Val Leu Thr Leu Leu Ile Thr Lys Leu Arg Ala Ser	
365 370 375	
GCA GTG CGA ACC TTT GGC AAG GAG GTT GAT ATC CTC CTG TTG CCT	1170
Ala Val Arg Thr Phe Gly Lys Glu Val Asp Ile Leu Leu Leu Pro	
380 385 390	
GCA TGC TTC CGG GAG GAC CTT CCG CTC CCG GAG GGG ATC CTG TTA	1215
Ala Cys Phe Arg Glu Asp Leu Pro Leu Pro Glu Gly Ile Leu Leu	
395 400 405	
GCA CTT AGG GGG TTT GCA GGA AAA ATC AGG AGT AGT GAC ACG CCA	1260
Ala Leu Arg Gly Phe Ala Gly Lys Ile Arg Ser Ser Asp Thr Pro	
410 415 420	
TCT ATT TTT GAC ATT GCG CGT CCA CTG CAT GTT TCT CTG AAA GTG	1305
Ser Ile Phe Asp Ile Ala Arg Pro Leu His Val Ser Leu Lys Val	
425 430 435	
AGG GTT ACC GAC CAC CCT GTG CCG GGA CCC ACT GTC TTT ACC GAC	1350
Arg Val Thr Asp His Pro Val Pro Gly Pro Thr Val Phe Thr Asp	
440 445 450	
GCC TCC TCA AGC ACC CAT AAA GGG GTG GTA GTC TGG AGG GAG GGC	1395
Ala Ser Ser Ser Thr His Lys Gly Val Val Val Trp Arg Glu Gly	
455 460 465	
CCA AGG TGG GAG ATA AAA GAA ATA GTT GAT TTG GGG GCA AGT GTA	1440
Pro Arg Trp Glu Ile Lys Glu Ile Val Asp Leu Gly Ala Ser Val	
470 475 480	
CAA CAA CTG GAG GCA CGC GCT GTG GCC ATG GCA CTT CTG CTG TGG	1485
Gln Gln Leu Glu Ala Arg Ala Val Ala Met Ala Leu Leu Leu Trp	

13		14
	485	490
CCG ACA ACG CCC ACT AAT GTA GTG ACT GAC TCT GCG TTT GTT GCG		495
Pro Thr Thr Pro Thr Asn Val Val Thr Asp Ser Ala Phe Val Ala		1530
	500	505
AAA ATG TTA CTC AAG ATG GGA CAG GAG GGA GTC CCG TCT ACA GCG		510
Lys Met Leu Leu Lys Met Gly Gln Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala		1575
	515	520
GCA GCT TTT ATT TTA GAG GAT GCG TTA AGC CAA AGG TCA GCC ATG		525
Ala Ala Phe Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ser Gln Arg Ser Ala Met		1620
	530	535
GCC GCC GTT CTC CAC GTG CGG AGT CAT TCA GAA GTG CCA GGG TTT		540
Ala Ala Val Leu His Val Arg Ser His Ser Glu Val Pro Gly Phe		1665
	545	550
TTC ACA GAA GGA AAT GAC GTG GCA GAT AGC CAA GCC ACC TTT CAA		555
Phe Thr Glu Gly Asn Asp Val Ala Asp Ser Gln Ala Thr Phe Gln		1710
	560	565
GCG TAT CCC TTG AGA GAG GCT AAA GAT CTT CAT ACC GCT CTC CAT		570
Ala Tyr Pro Leu Arg Glu Ala Lys Asp Leu His Thr Ala Leu His		1755
	575	580
ATT GGA CCC CGC GCG CTA TCC AAA GCG TGT AAT ATA TCT ATG CAG		585
Ile Gly Pro Arg Ala Leu Ser Lys Ala Cys Asn Ile Ser Met Gln		1800
	590	595
CAG GCT AGG GAG GTT GTT CAG ACC TGC CCG CAT TGT AAT TCA GCC		600
Gln Ala Arg Glu Val Val Gln Thr Cys Pro His Cys Asn Ser Ala		1845
	605	610
CCT GCG TTG GAG GCC GGG GTA AAC CCT AGG GGT TTG GGA CCC CTA		615
Pro Ala Leu Glu Ala Gly Val Asn Pro Arg Gly Leu Gly Pro Leu		1890
	620	625
CAG ATA TGG CAG ACA GAC TTT ACG CTT GAG CCT AGA ATG GCT CCC		630
Gln Ile Trp Gln Thr Asp Phe Thr Leu Glu Pro Arg Met Ala Pro		1935
	635	640
CGT TCC TGG CTC GCT GTT ACT GTG GAC ACC GCC TCA TCA GCG ATA		645
Arg Ser Trp Leu Ala Val Thr Val Asp Thr Ala Ser Ser Ala Ile		1980
	650	655
GTC GTA ACT CAG CAT GGC CGT GTT ACA TCG GTT GCT GCA CAA CAT		660
Val Val Thr Gln His Gly Arg Val Thr Ser Val Ala Ala Gln His		2025
	665	670
CAT TGG GCC ACG GCT ATC GCC GTT TTG GGA AGA CCA AAG GCC ATA		675
His Trp Ala Thr Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Pro Lys Ala Ile		2070
	680	685
AAA ACA GAT AAC GGG TCC TGT TTC ACG TCT AAA TCC ACG CGG GAG		690
Lys Thr Asp Asn Gly Ser Cys Phe Thr Ser Lys Ser Thr Arg Glu		2115
	695	700
TGG CTC GCG AGA TGG GGG ATA GCA CAC ACC ACC GGG ATT CCG GGA		705
Trp Leu Ala Arg Trp Gly Ile Ala His Thr Thr Gly Ile Pro Gly		2160
	710	715
AAT TCC CAG GGT CAA GCT ATG GTA GAG CGG GCC AAC CGG CTC CTG		720
Asn Ser Gln Gly Gln Ala Met Val Glu Arg Ala Asn Arg Leu Leu		2205
	725	730
AAA GAT AAG ATC CGT GTG CTT GCG GAA GGG GAC GGC TTT ATG AAA		735
		2250

15		16
Lys Asp Lys Ile Arg Val Leu Ala Glu Gly Asp Gly Phe Met Lys		
740	745	750
AGA ATC CCC GCC AGC AAA CAG GGG GAA CTA CTA GCC AAA GCA ATG	2295	
Arg Ile Pro Ala Ser Lys Gln Gly Glu Leu Leu Ala Lys Ala Met		
755	760	765
TAT GCC CTC AAT CAC TTT GAG CGT GGT GAA AAC ACG AAA ACA CCG	2340	
Tyr Ala Leu Asn His Phe Glu Arg Gly Glu Asn Thr Lys Thr Pro		
770	775	780
GTA CAA AAA CAC TGG AGA CCT ACC GTT CTT ACA GAA GGA CCC CCG	2385	
Val Gln Lys His Trp Arg Pro Thr Val Leu Thr Glu Gly Pro Pro		
785	790	795
GTT AAA ATA CGA ATA GAG ACA GGG GAG TGG GAA AAA GGA TGG AAC	2430	
Val Lys Ile Arg Ile Glu Thr Gly Glu Trp Glu Lys Gly Trp Asn		
800	805	810
GTG CTA GTC TGG GGC CGA GGT TAT GCC GCT GTG AAA AAC AGG GAC	2475	
Val Leu Val Trp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Val Lys Asn Arg Asp		
815	820	825
ACT GAT AAG GTT ATT TGG GTA CCC TCT CGA AAG GTT AAA CCG GAC	2520	
Thr Asp Lys Val Ile Trp Val Pro Ser Arg Lys Val Lys Pro Asp		
830	835	840
ATC ACC CAA AAG GAT GAG GTG ACT AAG AAA GAT GAG GCG AGC CCT	2565	
Ile Thr Gln Lys Asp Glu Val Thr Lys Lys Asp Glu Ala Ser Pro		
845	850	855
CTT TTT GCA GGC AGT TCT GAC TGG ATA CCC TGG GGA GAC GAG CAA	2610	
Leu Phe Ala Gly Ser Ser Asp Trp Ile Pro Trp Gly Asp Glu Gln		
860	865	870
GAA GGA CTC CAA GAA GAA GCC GCC AGC AAC AAG CAA GAA GGA CCC	2655	
Glu Gly Leu Gln Glu Glu Ala Ala Ser Asn Lys Gln Glu Gly Pro		
875	880	885
GGA GAA GAC ACC CTT GCT GCC AAC GAG AGT	2685	
Gly Glu Asp Thr Leu Ala Ala Asn Glu Ser		
890	895	

【0024】配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

配列:

AATTCCTATG CGAAAGTCTC GGGACATGAT AGAGTTGGGG GTTATTAACC GAGACGGGTC	60
GTGGAGCGA CCCCTGCTCC TTTTCCCCCG CGTAGCTATG GTTAGGGGGA GTATCCTAGG	120
AAGAGATTGT CTGCAGGCC TAGGGCTCCG CTTGACAAAT TTGTAGGGAG GGCCACTGTT	180
CTTACTGTG CGTACATCT GGCTATTCCG CTCAAATGGA AGCCAGACCA CACGCCCTGTG	240
TGGATTGACC AGTGGCCCT TCCTGAAGGT AAACCTGTAG CGGTAACGCA ATTAGTGGA	300
AAAGAATTAC AGTTAGGACA TATAGAACC TCACCTAGCT GTTGAACAC ACCTGTCTTT	360
GTGATCCGGA AGGCTTCCGG GTCTTATCGC TTATTGCATG ACTTACGCCG GTTAAACGCC	420
AAGCTTGTTT CTTTGGGGC TGTCCAACAG GGGGCGCCAG TTCTCTCCCG GCTCCCGCGT	480
GGCTGGCCCC TGATGGTCT AGACCTCAAG GATTGCTTCT TTTCTATCCC TCTTGGCGAA	540
CAAGATCGCG AAGCTTTTGC ATTTACGCTC CCCTCTGTGA ATAACCAGGC CCCCGCTCGA	600

ATCCTAGGAA GAGATTGTCT GCAGG 25

【0025】配列番号:3

配列の長さ:3252

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

17	18
AGATTCCAAT GGAAGGTCTT GCCCAAGGG ATGACCTGTT CTCCCACTAT CTGTCAGTTG	660
GTAGTGGGTC AGGTGCTCGA GCCCTTGCGA CTCAAGCACC CAGCTCTGCG CATGTTGCAT	720
TATATGGACG ATCTTTTGCT AGCCGCCTCA AGTCATGATG GGTGGAAGC GGCAGGGAAG	780
GAGGTTATCG GTACATTGGA AAGAGCCGGG TTCACTATTT CGCCGGATAA GATCCAGAGG	840
GAGCCCGGAG TACAATATCT TGGGTACAAG TTAGGCAGTA CGTATGTAGC ACCCGTAGGC	900
TTGGTAGCAG AAGCCAGGAT AGCCACCTTG TGGGATGTT AAAAGCTGGT GGGGTCACCT	960
CAGTGGCTTC GCCCAGCGTT AGGGATCCCG CCACGACTGA TGGGTCCCTT TTATGAGCAG	1020
TTACGAGGCT CAGATCCTAA CGAGGCGAGG GAATGGAATC TAGACATGAA AATGGCCTGG	1080
AGAGAGATCG TACAGCTTAG CACTACTGCT GCCTTGGAAC GATGGGACCC TGCCAGCCT	1140
CTGGAAGGAG CGGTGCTAG ATGTGAACAG GGGGCAATAG GGGTCTGGG ACAGGGACTG	1200
TCCACACACC CAAGGCCATG TTTGTGGTTA TTCTCCACCC AAGCCACCAA GGCCTTACT	1260
GCTTGGTTAG AAGTGCTCAC CCTTTGATT ACTAAGCTAC GCGCTTCGGC AGTGCGAACC	1320
TTTGGCAAGG AGTTGATAT CCTCTGTTG CTGTCATGCT TCCGGGAGGA CCTCCGCTC	1380
CCGGAGGGGA TCCTGTTAGC ACTTAGGGG TTTGCAGGAA AAATCAGGAG TAGTGACAGC	1440
CCATCTAATT TTGACATTGC GCGTCCACTG CATGTTTCTC TGAAGTGAG GGTACCGAC	1500
CACCTGTGTC CGGAGCCAC TGTCTTTACC GACGCTCCT CAAGCACCCA TAAAGGGTG	1560
GTAGTCTGGA GGGAGGCCC AAGGTGGGAG ATAAAGAAA TAGTTGATT GGGGCAAGT	1620
GTACAACAAC TGGAGGCACG CGCTGTGGCC ATGGCACTC TGCTGTGGC GACAACGCC	1680
ACTAATGTAG TGAAGTACT TCGCTTTGTT GCGAAAATGT TACTCAAGAT GGGACAGGAG	1740
GGAGTCCCGT CTACAGCGGC AGCTTTTATT TTAGAGGATG CGTTAAGCCA AAGTCAGCC	1800
ATGCCGCCCG TTCTCCACGT GCGGAGTCAT TCAGAAGTGC CAGGGTTTTT CACAGAAGGA	1860
AATGACGTGG CAGATAGCCA AGCCACCTTT CAAGCGTATC CCTTGAGAGA GGCTAAAGAT	1920
CTTCATACCG CTCTCCATAT TGGACCCCGC GCGCTATCCA AAGCGTGTA TATATCTATG	1980
CAGCAGGCTA GGGAGGTGTG TCAGACCTGC CCGATTGTA ATTCAGCCCC TGGCTTGGAG	2040
GCCGGGGTAA ACCCTAGGGG TTTGGGACCC CTACAGATAT GGCAGACAGA CTTTACGCTT	2100
GAGCCTAGAA TGGCTCCCCG TTCTGGCTC GCTGTACTG TGGACCCGC CTCATCAGCG	2160
ATAGTCGTAA CTCAGCATGG CCGTGTACA TCGGTGCTG CACAACATCA TTGGGCCACG	2220
GCTATCGCCG TTTTGGGAAG ACCAAGGCC ATAAAAACAG ATAACGGGTC CTGTTTCACG	2280
TCTAAATCCA CGCGGGAGTG GCTCGCGAGA TGGGGGATAG CACACACCAC CGGGATTCCG	2340
GGAAATTCCC AGGGTCAAGC TATGGTAGAG CGGGCCAACC GGCTCCTGAA AGATAAGATC	2400
CGTGTGCTTG CGGAAGGGGA CGGCTTTATG AAAAGAATCC CCGCCAGCAA ACAGGGGAA	2460
CTACTAGCCA AAGCAATGTA TGCCCTCAAT CACTTTGAGC GTGGTGAAA CACGAAAACA	2520
CCGTACAAA AACACTGGAG ACCTACCGTT CTTACAGAAG GACCCCGGT TAAATACGA	2580
ATAGAGACAG GGGAGTGGGA AAAAGGATGG AACGTGCTAG TCTGGGGCCG AGGTTATGCC	2640
GCTGTGAAAA ACAGGGACAC TGATAAGGTT ATTTGGGTAC CCTCTCGAAA GGTAAACCG	2700
GACATCACCC AAAAGGATGA GGTGACTAAG AAAGATGAGG CGAGCCCTCT TTTGACAGG	2760
AGTTCTGACT GGATACCTG GGGAGACGAG CAAGAAGGAC TCCAAGAAGA AGCCGCCAGC	2820
AACAAGCAAG AAGGACCCG AGAAGACACC CTTGCTGCCA ACGAGAGTTA ACTATATTCT	2880
CATTATTGGT GTCCTGCTCT TGTGTGAGGT TACGGGGGTA ACGAGCTGAT GTTCACTTAC	2940
TCGAGCAGCC GGGGAACCTT TGGATTACAT GGGCCAGCCG TACAGGCCAA ACGGATTCT	3000
GCCTTTCTAC ACAGTCAGCC ACCTCCCTT TTCAAACATG TTTGATAGGT ATCCCGTCCC	3060
CTATTTCTGA GGGTGATTTT AAGGGATATG TCTCTGATAA TTGCACCACT TTGGAACCTC	3120
ACCGGTTAGT CTCGAGAGGC ATCTCTGGC GACCTGAGAA CAGCACAACC CTTACCTATC	3180
AGAAGGATTC ATGCTTGTG TTAAGCTGA ATGTGTCTCT GTTGACGAG CCATCAGAAC	3240
TACAACCTGCT AG	3252

【0026】配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CAACGAATTC GACTGTTGCG CTACATCTG 29

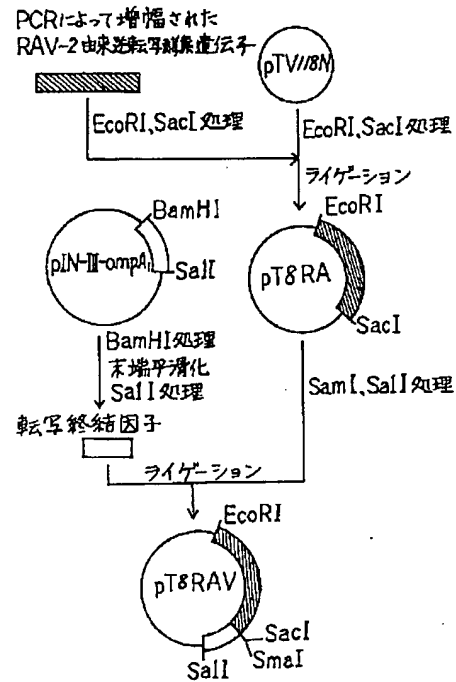
【0027】配列番号：5

50 配列の長さ：28

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：
ATAAGAGCTC TTAACCTCTCG TTGGCAGC 28
【図面の簡単な説明】
【図1】プラスミドpT8RAVの構築図である。

【図 1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

C 1 2-R	1:92)
(C 1 2 N	9/12
C 1 2 R	1:19)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:92)

(72)発明者 野田 晃弘
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 中島 和男
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内